

Activité des pyrophosphatases inorganiques acide et alcaline après traitement avec divers herbicides

M. DECLEIRE et W. DE CAT

Institut de Recherches Chimiques, Tervuren*

Acid and Alkaline Inorganic Pyrophosphatase Activity after Treatment with Various Herbicides

Abstract. Various herbicides are applied on seventeen-day-old cucumber seedlings growing in a nutrient solution.

After 1 and 3 days, acid and alkaline pyrophosphatase activities are measured in the leaves and the roots of seedlings treated with lethal doses of atrazine, chlortoluron, ioxynil, MCPA, dicamba, alachlor. The same enzymes are determined after 5 h in seedlings on which previously paraquat and DNOC were pulverised. In the leaves, acid pyrophosphatase activity is stimulated by almost all the herbicides, especially by ioxynil, paraquat and DNOC while alkaline pyrophosphatase remains similar to the controls. The alkaline and acid pyrophosphatase activity in the roots is either unchanged or stimulated or inhibited without any correlation with the various modes of action of the herbicides.

L'ion pyrophosphate se forme aux dépens d'ATP dans de nombreuses biosynthèses (acides nucléiques, coenzymes nucléotidiques, ...) et aussi dans les réactions d'activation des acides aminés et des acides gras. Il joue donc un rôle important dans le métabolisme des cellules.

Dans les plantes supérieures, son hydrolyse s'opère grâce à deux pyrophosphatases inorganiques: la pyrophosphatase acide dont l'activité est inhibée par le Mg^{++} et la pyrophosphatase alcaline dont l'activité est sous la dépendance de ce cation et qui, de plus, possède une affinité très élevée pour le pyrophosphate (NAGANNA et SRIPATHI 1954, NAGANNA *et al.* 1955). Plusieurs chercheurs ont essayé de mettre l'activité de l'une ou l'autre en relation avec l'état physiologique du tissu végétal. KISBAN *et al.* (1964) observent une activité croissante de la pyrophosphatase alcaline dans des feuilles de froment et d'orge détachées de 6 jours. RAUSER (1971) constate, dans des feuilles de haricot, de tabac et d'héliotrope une diminution parallèle des formes acides et alcalines en fonction de l'âge de la plante, KAR et MISHRA (1975) font état d'une activité croissante de la forme acide, et décroissante de la forme alcaline dans des feuilles senescentes de riz.

Ce dernier travail appuie l'idée généralement admise suivant laquelle la pyrophosphatase alcaline serait associée aux processus anaboliques tandis

Reçu le 20 février 1978; accepté le 11 mai 1978

* Adresse: B 1980 Tervuren, Museumlaan 5, Belgique.

que la pyrophosphatase acide serait liée davantage aux réactions cataboliques.

Puisque les herbicides provoquent l'arrêt de croissance en inhibant certaines fonctions essentielles, on peut supposer qu'ils induiront aussi des modifications d'activités pyrophosphatasiques.

Le présent travail a pour objet de déterminer dans quel sens elles évolueront.

Pour le réaliser, nous avons analysé les feuilles et les racines de plantules de concombre traitées par des herbicides à mode d'action divers.

Matériel et méthodes

1. Conditions culturales et traitement herbicide

Les plantules de concombre *Cucumis sativus* L. cv. Marketer sont cultivées en chambre climatisée, à 70% d'humidité relative; nyctopériode de 8 h; température diurne de 23 °C, nocturne de 18 °C.

L'intensité lumineuse au niveau de plantes est de 5000 lx. Les graines sont mises à germer dans de la vermiculite. Après 7 jours, les plantules sont dépotées, débarassées de la vermiculite et suspendues dans le milieu Hoagland 75% au moyen d'un carton perforé placé sur becher entouré d'un plastique noir.

Après 10 jours, on applique un traitement herbicide à dose létale. Il consiste soit à incorporer l'herbicide dans le milieu nutritif, soit à asperger les feuilles et cotylédons s'il s'agit d'un herbicide à action foliaire. Nous mentionnons ci-dessous la liste des herbicides testés, la catégorie à laquelle ils appartiennent et leur formule chimique:

Atrazine (triazine): 2-chloro-4-(éthylamino)-6-(isopropylamine)-S-triazine

Chlortoluron (dérivé d'urée): 3-(3-chloro-p-tolyl)1,1-diméthylurée

MCPA (phénoxyalcanoïque): acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique

Ioxynil (benzonitrile): 4-hydroxy-3,5-diiodobenzonitrile

Dicamba (acide benzoïque): acide 2 méthoxy-3,6-dichlorobenzoïque

Alachlore (amide): 2-chloro-2',6'-diéthyl-N-(méthoxyméthyl) acetanilide

DNOC (phénol): 4,6-dinitro-o-crésol

Paraquat (ammonium quaternaire): 1,1' diméthyl-4,4 dipyridylum.

Les six premiers herbicides ont été solubilisés dans le milieu de culture à raison de 0,5 ppm pour l'atrazine et le chlortoluron, à raison de 1 ppm pour le MCPA, l'ioxynil, le dicamba et l'alachlore.

Le DNOC et le paraquat ont été pulvérisés sur les feuilles aux doses respectives de 5000 et 800 ppm.

2. Mesure de l'activité des pyrophosphatases

Les feuilles ou les racines de 4 plantules de concombre sont congelées à l'azote liquide immédiatement après la récolte. Elles sont broyées au mortier à 4 °C avec un peu de sable et une quantité de tampon égale à cinq fois le poids de l'échantillon. Composition du tampon: Tris: 50 mM; dithiothréitol: 5 mM; EDTA: 2 mM; mis à pH 7,8.

Après une centrifugation de 20 min à 20 000 g à 4 °C, l'activité des pyrophosphatases est mesurée en triple sur 0,2 ml de surnageant.

a) Activité de la pyrophosphatase alcaline

A 3 ml de tampon Véronal-acétate 0,1 M de pH 8,6 contenant $MgCl_2$ 0,033 M, ajouter 0,5 ml de 0,01 M $Na_4P_2O_7 \cdot 10 H_2O$ et 0,2 ml d'extrait.

Incuber à 37 °C pendant 15 min. Ajouter 1 ml d'acide perchlorique à 20% (w/w).

Centrifuger 10 min à 5000 t min⁻¹. Prélever 0,5 ml. Ajouter 2,5 ml d'acide trichloracétique à 11,5% (w/v) suivi de 2 ml du réactif FeSO₄-Molybdate (TAUSSKY et SHORR 1953). Mesurer la densité optique à 580 nm après 30 min. Déterminer la teneur en phosphore minéral par rapport à des concentrations connues.

L'application du même mode opératoire, excepté l'incubation à 37 °C, donne la teneur initiale en P de l'échantillon.

La différence représente l'activité réelle de la pyrophosphatase.

b) Activité de la pyrophosphatase acide

Au lieu du tampon Véronal-acétate, utiliser un tampon acétate de pH 5,4 et appliquer le même mode opératoire.

Les résultats mentionnés dans le tableau constituent la moyenne d'essais réalisés en quadruple.

Résultats et discussion

Le tableau 1a groupe les activités des pyrophosphatases acide et alcaline extraites des feuilles de plantules traitées aux herbicides. Nos résultats sont en concordance avec ceux de NAGANNA *et al.* 1955, SIMMONS et BUTLER 1969 et RAUSER 1971. On y constate, en effet chez les témoins, une activité enzymatique en milieu alcalin de 5 à 7,5 fois plus élevée que celle en milieu acide et une certaine fluctuation entre les diverses séries de plantules analysées.

Aucun des traitements herbicides, qu'ils soient appliqués par voie racinaire ou foliaire, ne modifie l'activité de la pyrophosphatase alcaline. Celle-ci se situe toujours entre 96 et 104% des témoins. Par contre l'activité de la pyrophosphatase acide accuse une augmentation dont l'intensité est fonction de la nature de l'herbicide. Les deux herbicides à action foliaire le paraquat et le DNOC la font croître respectivement de 129% et de 165% après 5 heures d'application; les autres agissent d'une façon variable.

Le MCPA la stimule à peine (105—106%), l'atrazine et le chlortoluron davantage avec respectivement 112—118% et 128—119%, aux délais 1 et 3 jours. Quant au dicamba et à l'ioxynil, ils provoquent une activation proportionnelle à la durée du traitement.

Après 1 jour les pourcentages d'activité par rapport aux témoins sont respectivement 104 et 129%; après 3 jours ceux-ci se situent à 140 et 183%. L'alachlore provoque une baisse le premier jour suivi d'une augmentation le troisième jour.

Les résultats réunis dans le tableau 1b rendent compte de l'activité des pyrophosphatases extraites des racines. On remarque que la pyrophosphatase alcaline des racines témoins se révèle beaucoup moins active que dans les feuilles; elle fluctue en sens divers sous l'action des herbicides. Son activité n'est pratiquement pas modifiée par le chlortoluron, le paraquat et le DNOC. Elle est faiblement inhibée par l'atrazine et l'ioxynil, elle est stimulée par le MCPA, le dicamba et l'alachlore.

La pyrophosphatase acide se situe à un niveau inférieur aux témoins dans le cas d'application d'atrazine, de chlortoluron, d'ioxynil et d'alachlore.

(après 3 jours). Elle se montre supérieure après traitement au dicamba, paraquat, DNOC et alachlore (après 1 jour).

Les résultats obtenus démontrent que dans les feuilles le rapport de l'activité pyrophosphatasique alcaline sur l'activité pyrophosphatasique acide, représentatif de la senescence (KAR *et al.* 1975) ne constitue pas un critère permettant de déterminer la phytotoxicité d'un herbicide.

La pyrophosphatase acide manifeste une stimulation en réponse à l'action de presque tous les herbicides. Cette observation permet de penser à une senescence brusquée, due à une accélération des processus cataboliques spécialement prononcée dans le cas de traitement à l'ioxynil et au DNOC.

Il est intéressant de constater que la faible activation de la pyrophosphatase acide des feuilles, provoquée par le MCPA, auxine de synthèse, est compensée par une importante stimulation de la pyrophosphatase alcaline racinaire (125—191%). On sait, en effet (ASHTON et CRAFTS 1973) que ce type d'herbicide provoque dans les racines une biosynthèse anarchique des ARN, ADN et protéines.

Cette constatation mise à part, les pyrophosphatases racinaires apparaissent tantôt inhibées tantôt stimulées. En conséquence, aucune relation ne peut être dégagée entre leurs activités et les divers modes d'action des herbicides utilisés.

Références

- ASHTON, F. M., CRAFTS, A. S.: Mode of Action of Herbicides. — Pp. 266—288. Wiley-Interscience Publication 1973.
- KAR, M., MISHRA, D.: Inorganic pyrophosphatase activity during rice leaf senescence. — *Can. J. Bot.* **53** : 503—511, 1975.
- KISBAN, C., HORVATH, M., DEZSI, L., UDVARDY, J., FARKAS, G. L.: Role of root system in the regulation of enzyme levels in leaf tissues. — *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* **10** : 275—287, 1964.
- NAGANNA, B., RAMAN, B., VENUGOPAL, B., SRIPATHI, C. E.: Potato pyrophosphatases. — *Biochem. J.* **60** : 215—223, 1955.
- NAGANNA, B., SRIPATHI, C. E.: Pyrophosphatases in plants during growth. — *Nature* **174** : 593—594, 1954.
- RAUSER, W. E.: Inorganic pyrophosphatases in leaves during plant development and senescence. — *Can. J. Bot.* **49** : 311—316, 1971.
- SIMMONS, S., BUTLER, L. G.: Alkaline inorganic pyrophosphatase of maize leaves. — *Biochem. biophys. Acta* **172** : 150—157, 1969.
- TAUSSKY, H. H., SHORR, E.: A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. — *J. biol. Chem.* **202** : 675—685, 1953.